

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

O Teste de Motricidade sobre Grade como ferramenta de triagem no modelo de
Parkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina em ratos.

Roberta Bristot Silvestrin

Porto Alegre, outubro de 2008.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

O Teste de Motricidade sobre Grade como ferramenta de triagem no modelo de Parkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina em ratos.

Roberta Bristot Silvestrin

Orientador: Prof. Dr. Tadeu Mello e Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Alcyr Oliveira

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências
como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, outubro de 2008.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Tadeu pelos ensinamentos técnicos, pelos conselhos, pela paciência extrema nos meus momentos de estresse, pela disponibilidade integral, pela atenção, pela humildade, pela confiança e “torcida” pelo meu sucesso. Ao meu co-orientador Alcyr pelos ensinamentos e aconselhamentos.

Aos meus colegas de laboratório Cristiane, Lucas, Giovana e Júlia: vocês são sensacionais! Foi um prazer poder trabalhar e me divertir junto de vocês! Tenho muito a agradecer à Cris, uma pessoa excepcional que me ofereceu “teto”, sua paciência ao me ensinar, seu esforço, dedicação e responsabilidade ao trabalhar e seu carinho e atenção durante nossas conversas. Tu és um presente que o mestrado me deu! Ao Lucas, tenho que agradecer a paciência, os ensinamentos, as companhias e os conselhos! Ao Dioguinho, que nunca negou meus pedidos de socorro e sempre foi muito atencioso nas conversas de laboratório e quando eu precisava de uma opinião.

À UFRGS e ao PPG Neurociências por disponibilizarem a estrutura e os profissionais imprescindíveis à realização do meu mestrado e pela formação de qualidade. Ao CNPq, pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado.

“Dedico este trabalho aos meus pais,
Helenita e Carlos Roberto,
ao meu irmão Vinícius e
ao meu namorado Leonardo.”

"A arte e a ciência têm o seu ponto de encontro no método."

Edward Bulwer-Lytton

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Doença de Parkinson.....	11
1.2 Modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA	12
1.3 Atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas.....	13
1.4 Testes comportamentais	17
1.5 Atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto	17
1.6 Teste de Motricidade sobre grade.....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVO	19
3.1 Objetivos específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
5. RESULTADOS.....	20
5.1 Sensibilidade e Especificidade do TMG	20
5.2 Comparações entre testes, entre sessões e dependentes de tempo	21
6. APÊNDICE.....	29
The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's Disease	29
7. DISCUSSÃO	48

8. REFERÊNCIAS.....	54
----------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

ARIICO – atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto

DA - dopamina

DP – Doença de Parkinson

MF – metilfenidato

NAT – transportador de noradrenalina

SNpc – parte compacta da substância negra

TH – tirosina-hidroxilase

TMG – teste de motricidade sobre grade

RESUMO

A infusão de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na via nigroestriatal em ratos é um modelo da Doença de Parkinson (DP). O Teste de Motricidade sobre Grade (TMG ou, em inglês, *footfault test*) é um teste comportamental utilizado para avaliar a função motora em ratos. Observamos que animais lesionados unilateralmente com 6-OHDA mostram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto quando colocados no aparato do TMG por 3 minutos e isso pode ser utilizado como índice para detectar animais lesionados. Nossos resultados mostraram que o TMG tem sensibilidade e especificidade de 100% para lesões maiores que 94 e 64%, respectivamente (Curva Operacional Característica: Área sob a curva = 0,988). Um modelo de regressão logística binária mostrou $\exp(B) = 1,116$ (95% CI, 1,007-1,236) e $C = -9,081 \pm 4,554$ ($p = 0,046$) utilizando a imunistoquímica para tirosina-hidroxilase como técnica padrão (cada unidade representa 10% de lesão). Além disso, o TMG foi mais sensível que o teste de atividade rotacional induzida por apomorfina 1mg/kg quando os testes foram realizados em dias diferentes e foi menos sensível que o teste de atividade rotacional induzida por metilfenidato 40mg/kg (Teste do Sinal, $p < 0,05$). Portanto, o TMG pode ser bastante útil nesse modelo animal de DP para triagem de animais, uma vez que é um teste rápido, simples e não requer drogas para indução de atividade rotacional.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, 6-OHDA, rato, teste de motricidade sobre grade, triagem.

ABSTRACT

The administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the nigrostriatal pathway is a rat model of Parkinson's Disease (PD). The footfault test is a behavioural task in which rodents have their motor functions assessed. Here, we observed that unilaterally 6-OHDA-lesioned animals show a context-induced ipsilateral rotational behaviour when placed on the footfault apparatus for 3 minutes and this may be used as index to detect lesioned animals. Our results showed a sensitivity and specificity of 100% for lesions higher than 94 and 64%, respectively (ROC curve: AUC = 0.988). A binary logistic regression model showed an $\exp(B) = 1.116$ (95% CI, 1.007-1.236) and $C = -9.081 \pm 4.554$ ($p = 0.046$) using the nigral tyrosine hydroxylase immunoccontent as standard (each unit represents a 10%-lesion extension). Additionally, the footfault test was more sensitive than apomorphine challenging at 1 mg/kg when these tests were carried out days apart and it was less sensitive than methylphenidate at 40 mg/kg (Sign Test, $p < 0.05$). Therefore, the footfault test may be very useful in the PD animal model for screening animals since it is fast and simple and it does not require a drug to induce rotational activity.

Key-words: Parkinson's Disease, 6-OHDA, rat, footfault test, screening

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma alteração neurodegenerativa progressiva que atinge 2,5% da população mundial, está relacionada ao envelhecimento, mas também pode atingir indivíduos jovens. A DP ocasiona lentidão dos movimentos, tremores em repouso e dificuldade de equilíbrio, podendo levar a disfunções cognitivas, depressão, ansiedade e distúrbios de sono (Constantino e Honig, 2001). O quadro clínico resulta principalmente da perda de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNpc), o que ocasiona a redução dos níveis de dopamina (DA) e seus metabólitos no corpo estriado (Alexi et al., 2000). Estas estruturas são componentes dos núcleos da base e participam de um circuito neural que dá suporte à preparação das ações motoras do córtex cerebral frontal. Uma característica essencial do estado parkinsoniano é a aumentada atividade neuronal do globo pálido interno que leva à inibição excessiva do sistema motor talâmico-cortical (Obeso et al., 2000) (Fig. 1).

Não existe uma ferramenta de diagnóstico para a DP e o único exame definitivo é a observação histológica *post mortem* do tecido encefálico com identificação dos chamados Corpos de Lewy. Os Corpos de Lewy são inclusões citoplasmáticas formadas por agregados protéicos e sua presença é característica, porém não exclusiva, da DP (Sulzer, 2007). O diagnóstico da DP é dado frente ao quadro clínico clássico da doença, entretanto, os sintomas só se tornam aparentes quando o paciente já apresenta em torno de 40% de perda neuronal na SNpc e 80% de depleção dopaminérgica no corpo estriado (Hornykiewicz, 1993; Kirik et al., 1998).

Apesar de haver muitos estudos sobre a DP, a sua etiologia não é conhecida. No entanto, sabe-se que diversos mecanismos podem estar envolvidos no processo de neurodegeneração, dentre os quais incluem-se o estresse oxidativo (Waragai et al., 2006; Zhang et al., 1999), a neuroinflamação (Gao et al., 2003; Whitton, 2007) e o mau enovelamento protéico (Hald and Lotharius, 2005; Lim et al., 2003).

O tratamento farmacológico para a DP é feito normalmente com fármacos que substituem a DA (*e.g.*, a levodopa), freqüentemente acompanhados de outros

medicamentos (carbidopa, benserazida ou ainda selegilina) ou por agonistas dopaminérgicos (e.g., bromocriptina). Entretanto, em estágios mais adiantados da doença, pode ser necessária intervenção cirúrgica (Weiner, 2004). Todos estes tratamentos, no entanto, têm eficácia temporária ou reduzida, podendo ainda ocasionar efeitos colaterais, como ocorre no tratamento com levodopa. Um importante fato a considerar é que não há terapia regenerativa e a DP é progressiva. Desta forma, estratégias para o aumento da sobrevivência e regeneração neuronal ainda estão por ser desenvolvidas com o objetivo de repor as células perdidas ao longo da DP.

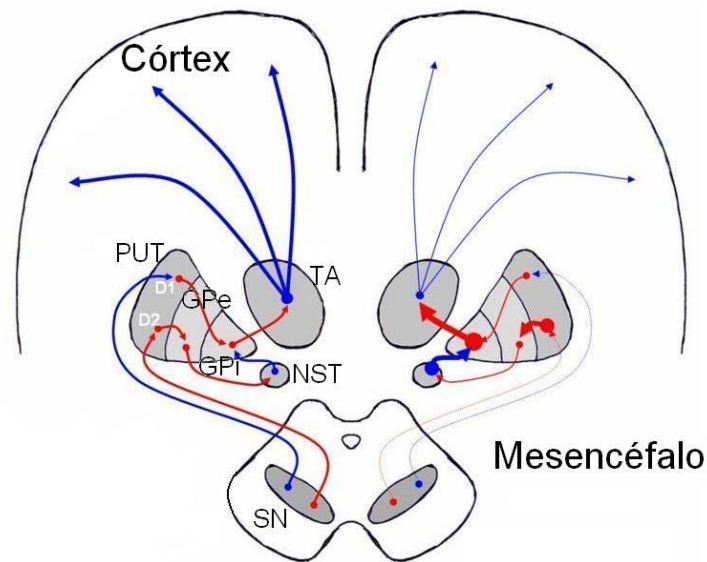


Figura 1. Circuitaria envolvida na DP. À esquerda, circuito neuronal normal. À direita, circuito alterado na DP. A comunicação nigroestriatal é interrompida devido à morte de neurônios na parte compacta da SN, ocasionando maior atividade do GPi que, por sua vez, causa maior inibição do sistema motor tálamo-cortical. GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; PUT, putâmen; SN, substância negra; TA, tálamo. Linhas azuis representam vias excitatórias e linhas vermelhas representam vias inibitórias.

1.2 Modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA

Modelos animais de doenças constituem ferramentas importantes no estudo de causas, sintomas e outras características fisiológicas envolvidas em processos

patológicos e são imprescindíveis na pesquisa de novas opções terapêuticas. Combinados aos modelos animais, os testes comportamentais são estratégias indispensáveis para a obtenção de informações sobre o funcionamento dos sistemas motor e cognitivo do animal.

O modelo animal de hemiparkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é bem estabelecido e amplamente utilizado para o estudo da DP. Nesse modelo, a administração intracerebral unilateral de 6-OHDA na substância negra (Hefti et al., 1980b; Yuan et al., 2005), feixe prosencefálico medial ou corpo estriado leva a uma diminuição dos níveis de DA nos núcleos da base, mimetizando a depleção dopaminérgica que ocorre na DP, o que confere ao modelo alto valor preditivo e de construto (Deumens et al., 2002).

A 6-OHDA é uma neurotoxina estruturalmente análoga à DA e à noradrenalina. É através dos transportadores desses neurotransmissores que a 6-OHDA atinge o interior do neurônio. Essa toxina exerce seus efeitos neurotóxicos em duas etapas: (1) acúmulo em neurônios catecolaminérgicos seguida de alteração da homeostase celular e, (2) em conseqüência, dano neuronal. A 6-OHDA leva o neurônio à morte devido à produção de espécies reativas de oxigênio e quinonas, além de promover uma disfunção mitocondrial (Simola et al., 2007)(Fig. 2).

1.3 Atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas

A lesão unilateral do feixe prosencefálico medial leva a assimetrias tanto nos níveis de DA quanto na sensibilidade a ela. Quando ocorre lesão do feixe prosencefálico medial, há diminuição ipsilateral de DA no corpo estriado e no núcleo *accumbens*, assim como em outras áreas, como bulbo olfatório, septo e córtex pré-frontal (Torres e Dunnett, 2007). O grau de lesão causado pela administração unilateral de 6-OHDA pode ser inferido após a administração de drogas dopaminomiméticas como a anfetamina, o metilfenidato (MF) e a apomorfina. A ação desses agentes gera um desequilíbrio acentuado na transmissão dopaminérgica entre os hemisférios, visto que o dano foi causado a somente um deles, com conseqüente assimetria postural e de movimentos, o que vai se refletir em um padrão locomotor de rotação que é

amplamente utilizado como índice de lesão (Fig. 3). Assim, utilizando-se a atividade rotacional induzida por drogas, verifica-se comportamentalmente a eficácia de potenciais tratamentos da DP, como drogas ou terapia celular (Mukhida et al., 2001; Visanji et al., 2006).

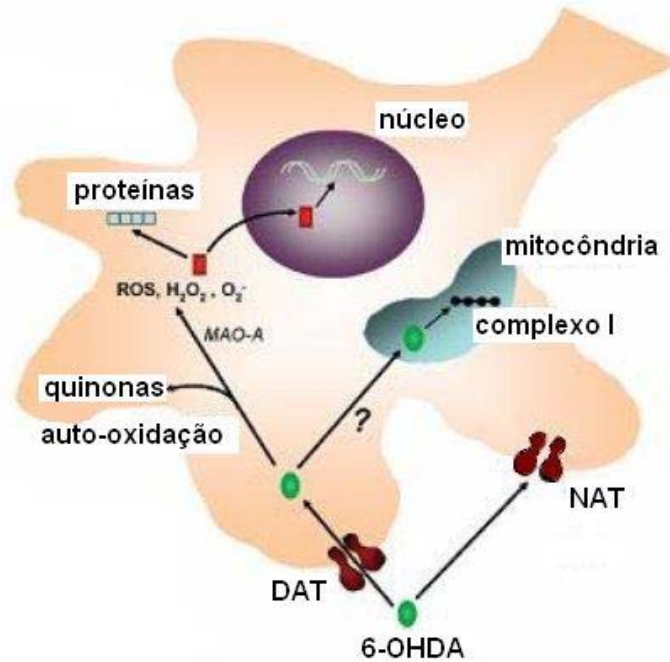


Figura 2. Mecanismos da neurotoxicidade induzida por 6-OHDA. No interior dos neurônios, a 6-OHDA sofre degradação enzimática pela monoamina-oxidase A e auto-oxidação, gerando diversas espécies citotóxicas que levam à injúria neuronal ao danificar proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, a 6-OHDA pode levar à neurotoxicidade através da disfunção do complexo mitocondrial I. Adaptado de Simola et al., 2007.

A anfetamina é um agonista dopaminérgico indireto que, ao interagir com o transportador de DA, aumenta a liberação desta e gera maiores quantidades extracelulares desse neurotransmissor no corpo estriado e no núcleo *accumbens* (Kuczenski e Segal, 1997). A anfetamina foi a primeira droga a ser utilizada no modelo de DP por 6-OHDA e é capaz de induzir atividade rotacional ipsilateral à infusão da neurotoxina em animais com um mínimo de 50% de lesão (Hefti et al., 1980a; Ungerstedt e Arbuthnott, 1970). O metilfenidato é um estimulante do sistema nervoso central que, quando administrado sistemicamente, se liga ao transportador de DA e

inibe a recaptção desse neurotransmissor, promovendo, assim, um aumento de DA extracelular no corpo estriado. O MF também pode ser utilizado no estudo da DP (Chopin et al., 1999), pois promove atividade rotacional ipsilateral e sua dose de 20 mg/kg corresponde, em termos de efeitos comportamentais, a 2,5 mg/kg de anfetamina (Kuczenski e Segal, 1997).

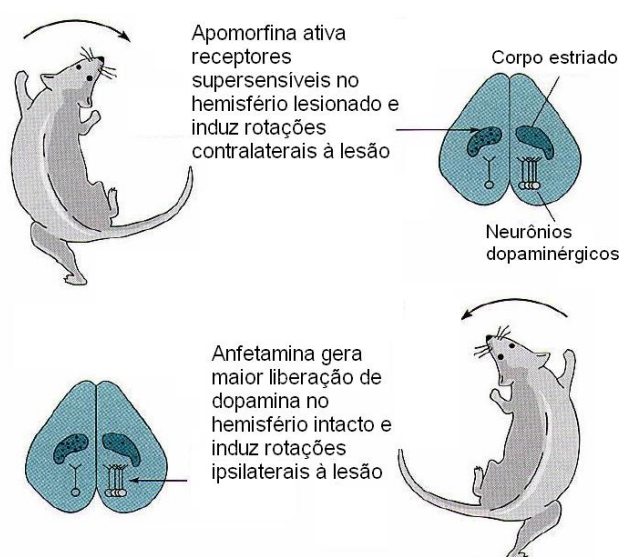


Figura 3. Atividade rotacional induzida por apomorfina e anfetamina.

A apomorfina é um agonista dopaminérgico direto que age sobre receptores D1 e D2. Em animais lesionados unilateralmente com mais de 90% de morte de neurônios nigroestriatais, a apomorfina vai ser mais efetiva no hemisfério lesionado devido à sensibilização dos receptores, o que promove rotações contralaterais à lesão (Hefti et al., 1980b; Hudson et al., 1993) (Figs. 3 e 4).

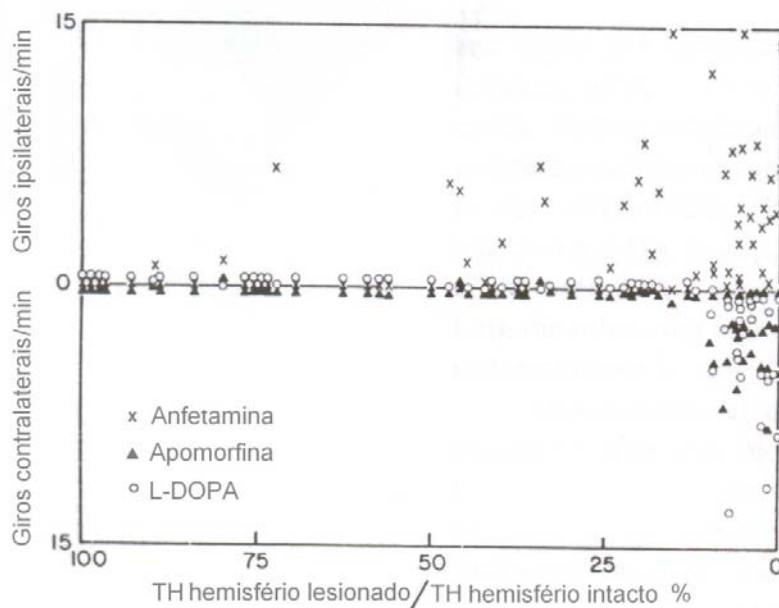


Figura 4. Atividade rotacional induzida por drogas em animais com lesões nigroestriatais unilaterais de diversas severidades. Salvo algumas exceções, a anfetamina induz rotações ipsilaterais em animais com atividade da tirosina-hidroxilase (TH) estriatal reduzida em 0 a 50% dos níveis dos controles, enquanto que a apomorfina induz rotações contralaterais em animais com menos de 10% dos níveis dos controles. Adaptado de Hefti et al., 1980a.

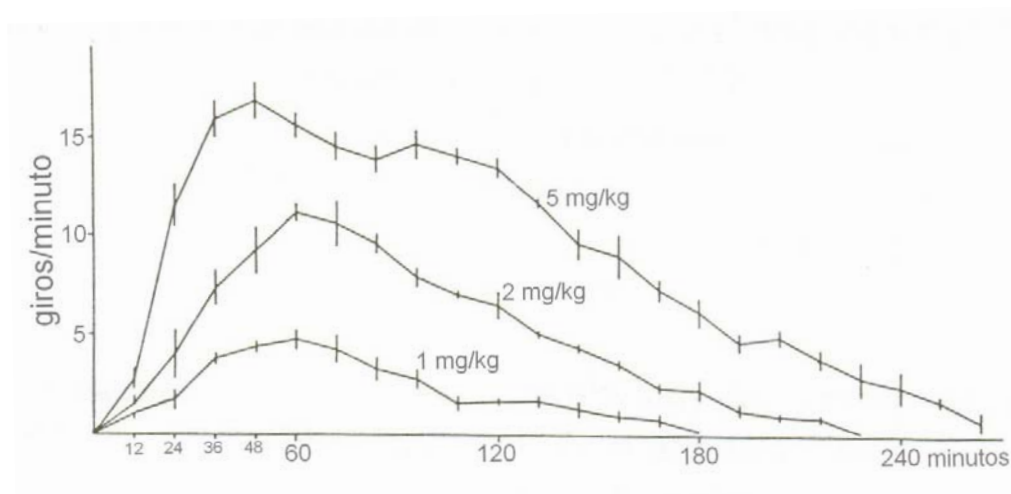


Figura 5. Atividade rotacional após administração de anfetamina nas doses 1, 2 e 5 mg/kg. Cada curva representa a média de velocidade de rotação para 4 animais. A média de velocidade de rotação e o erro padrão da média estão plotados para cada período de 12 minutos. As curvas diferem claramente em sua ascensão, valor do pico e duração. Adaptado de Hefti et al., 1980.

Apesar de sua ampla utilização, o teste de Atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas com agentes dopaminomiméticos é um teste invasivo, pois exige a administração de drogas que causam alterações moleculares e comportamentais no animal (Fig. 5), além de requerer dezenas de minutos para sua execução (Morelli et al., 1989; Ungerstedt e Arbuthnott, 1970).

1.4 Testes comportamentais

Para a identificação de déficits motores, sensoriais e cognitivos, outros testes podem ser aplicados no modelo descrito e contribuem com informações complementares àquelas obtidas com os testes de rotação. Dentre eles, estão o teste de retração da pata, o teste de tempo de reação, o teste de pressão de barra, o labirinto aquático de Morris, o teste de uso de membro anterior, o teste da escada, o teste de travessia de trave, entre outros. Algumas dessas tarefas são utilizadas para a reprodução e estudo de sintomas pré-clínicos, onde o foco está em situações de menor dano dopaminérgico (Deumens et al., 2002; Simola et al., 2007). Alguns testes requerem ainda sessões de habituação, sessões de treino ou sessões de teste repetidas ou de longa duração (Castaneda et al., 2005; Mukhida et al., 2001; Truong et al., 2006).

1.5 Atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto

Animais unilateralmente lesionados apresentam, tipicamente, rotações ipsilaterais que não necessitam da administração de alguma droga dopaminomimética para sua indução (Costall et al., 1976; Dunnett e Iversen, 1982). Essas rotações parecem estar relacionadas com o grau de atividade estriatal (Schwartzing e Huston, 1996) e foram utilizadas por alguns autores na avaliação de animais lesionados com 6-OHDA (Matsuda et al., 1995; Metz et al., 2005). Propomos, neste trabalho, que essas rotações não dependentes de droga para sua indução podem aparecer quando o animal é exposto a um contexto diferente (por exemplo, à uma grade ou ao campo aberto). Assim, preferimos introduzir o termo “atividade rotacional ipsilateral induzida

pelo contexto” para as rotações induzidas pela exposição a um ambiente novo. Adicionalmente, definimos uma variável binária, ARIICO (que é uma abreviação de “atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto”), cujo valor unitário indica que o animal realizou pelo menos um giro ipsilateral de 360 graus em torno de seu próprio eixo durante o teste. A ausência de giro ipsilateral ou a presença de atividade rotacional contralateral confere valor zero à variável.

1.6 Teste de Motricidade sobre Grade

O teste de Motricidade sobre Grade (TMG) ou *footfault test* (Fig. 6) foi originalmente criado para avaliar a atividade locomotora de animais que apresentam lesões unilaterais (Barth et al., 1990). Ao moverem-se sobre a grade, os animais colocam suas patas sobre o arame para seu apoio. Ocasionalmente, animais intactos posicionam uma de suas patas de forma imprecisa de modo que o membro desliza através da abertura da grade, consistindo em um “erro” (ou *footfault*). Nesses animais, os erros são tipicamente simétricos, um padrão que normalmente é alterado quando animais lesionados unilateralmente são testados.



Figura 6. Aparato do TMG

O TMG já foi utilizado em modelos animais de isquemia (Lubics et al., 2005; Modo et al., 2000; Pitsikas et al., 2001), lesão medular (Himes et al., 2006) e piramidotomia (Starkey et al., 2005). Em todos os estudos, o foco principal da análise do teste foi a assimetria do número de erros. No entanto, o TMG pode ter outro uso potencial no modelo animal de parkinsonismo induzido por administração unilateral de 6-OHDA, visto que observamos que animais lesionados podem apresentar rotações ipsilaterais à lesão quando colocados sobre a grade. Observamos, então, o valor da variável ARIICO (definição acima) para cada animal exposto ao TMG e verificamos sua potencialidade como parâmetro para selecionar animais lesionados.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas ser um índice padrão para a triagem de animais lesionados unilateralmente com 6-OHDA, a sua execução requer a utilização de drogas que promovem alterações moleculares e comportamentais significativas, além de exigir um longo tempo de testagem por animal. Quando comparado ao teste de atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas, o TMG é um teste muito rápido e fácil de ser executado, além de ser menos invasivo.

3. OBJETIVO

Verificar a aplicabilidade do TMG como ferramenta de triagem de animais lesionados no modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA.

3.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a sensibilidade e especificidade do Teste de Motricidade sobre Grade na detecção de animais lesionados utilizando uma Curva

Operacional Característica que tem a imunoistoquímica para TH como procedimento padrão;

2. Comparar a sensibilidade do Teste de Motricidade sobre Grade com a sensibilidade dos testes de atividade rotacional induzida por metilfenidato e apomorfina;

3. Verificar se a atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto é útil na identificação de animais lesionados quando esta é observada no campo aberto;

4. Verificar se a atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto no Teste de Motricidade sobre Grade se mantém quando o animal é testado novamente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada foi apresentada na Introdução e descrita em detalhes no corpo do artigo submetido, constante do apêndice desta Dissertação.

5. RESULTADOS

5.1 Sensibilidade e Especificidade do TMG

Os animais que receberam infusão de 6-OHDA e que mostraram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto no TMG apresentavam lesões de maior extensão do que aqueles que não mostraram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto (Teste U de Mann-Whitney, $p=0,009$) (Fig. 7). Dois exemplos de imunoistoquímica para TH são mostrados na Fig.8.

A Figura 9 ilustra a Curva Operacional Característica para ARIICO utilizando-se a imunoistoquímica como procedimento padrão. Os dados foram obtidos a partir dos resultados na Fig. 1 ($n=14$) combinados com os 39 animais *sham* operados (ou seja, aqueles que receberam somente o veículo da 6-OHDA). Considerou-se que os animais *sham* operados apresentaram 0% de lesão e, em nossos resultados todos não

mostraram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto. Os dados obtidos estão de acordo com o modelo de regressão logística binária (Teste de Hosmer e Lemeshow; $\chi^2 = 2,322$, $df = 2$, $p = 0,313$), cujos parâmetros foram estimados, como se segue: (1) para animais que não apresentaram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto, $B = -1,883 \pm 0,406$ (SE; $p < 0,001$); (2) para aqueles que apresentaram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto, $B = -0,109 \pm 0,052$ (SE, $p = 0,037$), $\exp(B) = 1,116$ (IC de 95%, de 1,007 a 1,236), e $C = -9,081 \pm 4,554$ ($p = 0,046$).

Esses parâmetros predizem que (1) animais com lesões nigrais maiores de 90% têm alta probabilidade de apresentar atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto e (2) que o TMG é extremamente específico para detectar animais lesionados, principalmente quando a especificidade se refere a lesões maiores que 50%. O modelo de regressão não foi preciso na estimativa da especificidade para lesões maiores de 90% devido ao intervalo de confiança dos parâmetros avaliados. No entanto, a Curva Operacional Característica mostra que tanto a sensibilidade quanto à especificidade foram maiores que 85% para um limiar de lesão de 90% e sensibilidade é bem menor para um limiar de lesão de 50% (0,583).

5.2 Comparações entre testes, entre sessões e dependentes de tempo

Como mostra a Tabela I, houve diferença na sensibilidade entre o TMG e o teste de atividade rotacional induzida por MF 40 mg/kg (Teste do Sinal, $p=0,021$), mas não com MF 20 mg/kg (Teste do Sinal, $p=0,375$). Houve diferença na sensibilidade quando o teste de atividade rotacional induzida por apomorfina foi conduzido 15 dias após o TMG, mas não quando realizado logo após o mesmo (Teste do Sinal, $p= 0,016$ e 1,00, respectivamente) (Tabela II).

Conforme a Tabela III, a sensibilidade do TMG foi maior do que aquela obtida pelo teste no campo aberto (0,82 e 0,47, respectivamente), uma vez que dos 17 animais observados em ambos os testes, 14 e 8, respectivamente, mostraram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto (Teste do Sinal, $p=0,031$). No entanto, considerando-se os mesmos animais, não houve diferença na sensibilidade entre o campo aberto e o teste de atividade rotacional induzida por apomorfina (Teste do Sinal, $p= 1,00$).

Levando-se em conta os animais que foram submetidos duas vezes ao TMG, somente um de 11 animais que apresentaram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto na primeira sessão mostrou o mesmo comportamento quando re-exposto ao teste, indicando que há redução na atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto ao longo de sessões em dias subseqüentes (Teste do Sinal, $p=0.002$).

Não foram observadas rotações contralaterais no TMG durante nossos experimentos. Como mencionado anteriormente, nenhum dos 39 animais *sham* operados apresentou atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto.

Silvestrin et al., 2008.

Tabela I. Atividade rotacional no TMG e após teste de atividade rotacional induzida por com MF.

Atividade Rotacional		MF20 ^a		MF40 ^b	
		Não	Sim	Não	Sim
TMG	Não	2	1	3	9
	Sim	4	10	1	12
	Total	17		25	

Tabulação cruzada do número de animais que apresentaram ou não atividade rotacional nos dois diferentes testes, TMG (linhas) e teste de atividade rotacional induzida por MF em duas doses (colunas: MF20 e MF40 representam MF 20 e 40 mg/kg, respectivamente). ^a e ^b indicam $p = 0,375$ e $0,021$, respectivamente (Teste do Sinal). TMG, teste de motricidade sobre grade; MF, metilfenidato.

Silvestrin et al., 2008.

Tabela II. Atividade rotacional no TMG e após teste de atividade rotacional induzida por apomorfina.

Atividade Rotacional		APO 0 dias ^a		APO 15 dias ^b	
		Não	Sim	Não	Sim
TMG	Não	7	0	3	0
	Sim	1	5	7	7
	Total	13		17	

Tabulação cruzada do número de animais que apresentaram ou não atividade rotacional nos dois diferentes testes, TMG (linhas) e teste de atividade rotacional induzida por apomorfina (colunas). O teste de atividade rotacional induzida por apomorfina (1mg/kg) foi realizado no dia seguinte à realização do TMG (APO 0 dia) ou 15 dias após o TMG (APO 15 dias). ^a e ^b indicam $p = 1,00$ e $0,016$, respectivamente (Teste do Sinal). TMG, teste de motricidade sobre grade; APO, apomorfina.

Silvestrin et al., 2008.

Tabela III. Atividade rotacional no campo aberto, no TMG e após teste de atividade rotacional induzida por apomorfina.

Atividade Rotacional		TMG ^a		APO ^b	
		Não	Sim	Não	Sim
Campo aberto	Não	3	6	8	1
	Sim	0	8	2	6
	Total	17		17	

Tabulação cruzada do número de animais que apresentaram ou não atividade rotacional no campo aberto (linhas), no TMG e após teste de atividade rotacional induzida por apomorfina (1mg/kg) (colunas). ^a e ^b indicam $p = 0,031$ e $1,00$, respectivamente (Teste do Sinal). TMG, teste de motricidade sobre grade; APO, apomorfina.

Silvestrin et al., 2008.

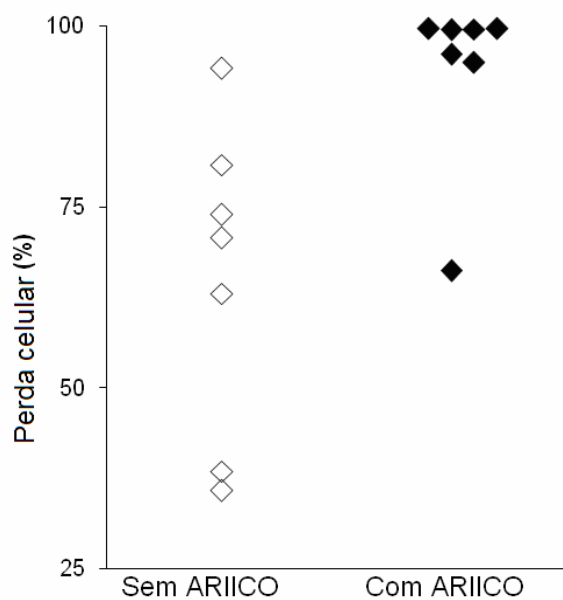


Figura 7. Extensão da lesão observada em animais submetidos ao TMG que apresentaram atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto ou não. TMG, teste de motricidade sobre grade; ARIICO, atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto. Teste U de Mann-Whitney, $p=0,009$.

Silvestrin et al., 2008.

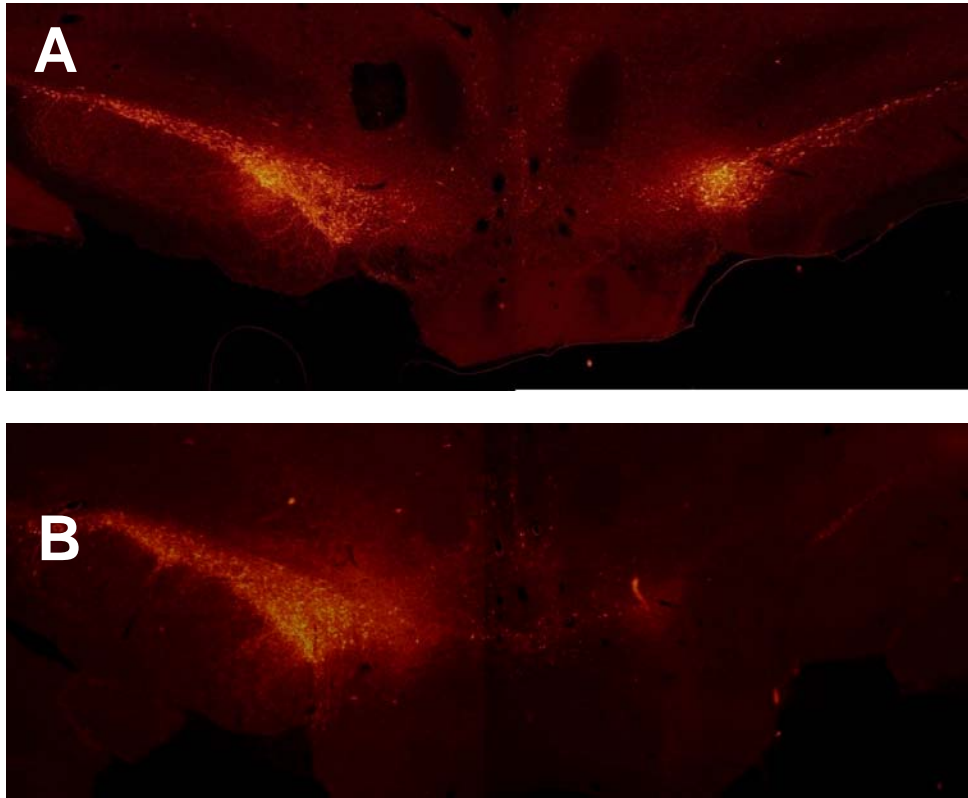


Figura 8. Imunoistoquímica para TH mostrando células produtoras de dopamina na parte compacta da substância negra de um animal (A) que não mostrou atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto e apresentou 73% de perda celular, e (B) de um animal que não mostrou atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto e apresentou 99% de perda celular. Em ambos os casos, o hemisfério ipsilateral à infusão de 6-OHDA é mostrado à direita. TH, tirosina-hidroxilase; TMG, teste de motricidade sobre grade; ARIICO, atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto.

Silvestrin et al., 2008

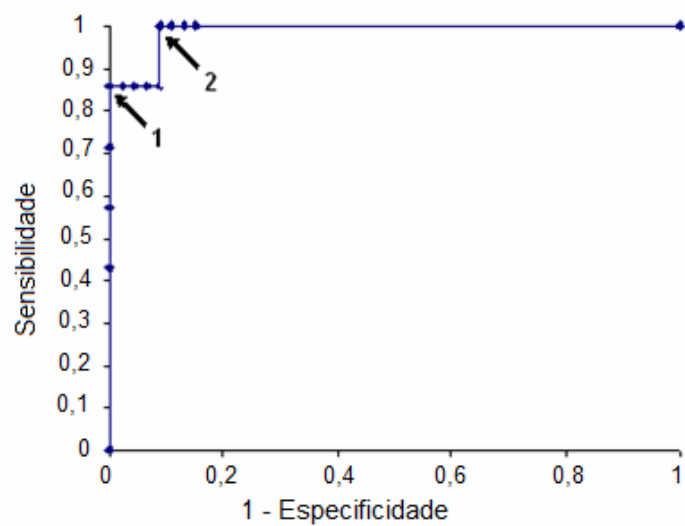


Figura 9. Curva operacional característica para ARIICO em diferentes limiares de extensão de lesão. Área sob a curva = 0,988. Setas 1 e 2 denotam valores de lesão de 95% e 65%, respectivamente.

6. APÊNDICE

Manuscrito aceito para publicação no Journal of Neuroscience Methods.

The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's Disease

Roberta Bristot Silvestrin

Programa de Pós-Graduação em Neurociências – ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Sala 107, CEP 90.046-900 - Porto Alegre, RS, Brasil

Phone/Fax 5551 3308-3092

betasilvestrin@yahoo.com.br

Lucas Fürstenau de Oliveira

Complexo de Ensino Superior de Cachoeirinha.

Silvério Manoel da Silva, 160

Colinas 94940-243 - Porto Alegre, RS – Brasil

Phone: (51) 34418650

luke@ufrgs.br

Cristiane Batassini

Programa de Pós-Graduação em Neurociências – ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Sala 107, CEP 90.046-900 - Porto Alegre, RS, Brasil

Phone/Fax 5551 3308-3092

cris.batassini@terra.com.br

Alcyr Oliveira

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Departamento de Saúde Coletiva.

Rua Sarmento Leite, 245 – Centro

90050-170 - Porto Alegre, RS – Brasil

Phone: (51) 33038826

Alcyr.oliveirajr@gmail.com

Tadeu Mello e Souza (Corresponding author)

Departamento de Bioquímica—ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - anexo CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: 5551 33085570

tmelloesouza@yahoo.com.br

The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's Disease

Introduction

Animal models of disease provide useful and indispensable tools for studying causes, symptoms, and other physiological features involved in pathological processes. Additionally, behavioural tests give us indirect information on the state of cognitive and locomotor systems.

The administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the rat substantia nigra, medial forebrain bundle, or striatum leads to a depletion of dopamine in the basal ganglia (Hefti et al., 1980; Yuan et al., 2005). This effect mimics the dopaminergic depletion observed in Parkinson's Disease (PD) conferring to the rat model a solid construct and predictive value (Deumens et al., 2002).

Several behavioural tests can be applied to assess different symptoms and deficits in the model, such as the reaction-time test, the paw retraction time test, the bar-pressing task, the staircase test, forelimb asymmetry, the narrow beam test (Deumens et al., 2002), somatosensory neglect (Castaneda et al., 2005), and the footprint analysis (Metz et al., 2005). When animals are unilaterally lesioned, they present rotational activity after challenging with a dopamine-acting drug, such as amphetamine, apomorphine, and more recently, methylphenidate (MP) (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970; Chopin et al., 1999). This drug-induced rotational activity (DIRA) is usually considered as index to infer dopamine depletion (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970; Hefti et al., 1980). However, drug challenging demands a long session and also induces long-term biochemical changes (Morelli et al., 1989). Here we present a 3-minute and drug-free test for screening unilaterally lesioned animals in the 6-OHDA PD model.

The footfault test is a behavioural task employed to verify the animal's ability to place its paws during the exploration of an elevated grid (Hernandez and Schallert, 1988; Starkey et al., 2005). The test has been used in animal models of ischemic injury (Modo et al., 2000; Pitsikas et al., 2001; Lubics et al., 2005), spinal cord lesion (Himes et

al., 2006), and pyramidotomy (Starkey et al., 2005). Although the main concern in these cases was to observe the asymmetry of foot failure from inaccurate paw placement leading to slipping through the grid, the footfault test has potential use in the 6-OHDA model. We observed that unilaterally 6-OHDA-lesioned animals show context-induced ipsilateral rotational activity (CIIRA) when placed on the apparatus. Therefore, the aim of the present work was to verify whether the observation of CIIRA in the footfault test can be used as index for animal screening of nigrostriatal lesions. In order to do that, we evaluated the sensitivity and the specificity of the footfault method in detecting lesioned rats by using tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry as a Gold standard and we also compared its sensitivity with those of MP and apomorphine challenging. Additionally, we observed whether CIIRA is useful in screening lesioned rats observing this behaviour in a less stressful place, the open field. Finally, we verified whether CIIRA is stable across footfault test sessions.

Material and Methods

Subjects

Adult male Wistar rats (290 – 350g, 110 days old) were obtained from the Animal House Unit of the Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, and kept on a 12-h light/dark cycle (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.) in a temperature-controlled (22°C) colony room. The animals were housed 5 per cage and had access to water and standard lab chow *ad libitum*. They were handled in accordance to the governmental and Brazilian Experimental Biology Societies Federation guidelines.

6-OHDA Administration.

The animals were anesthetized with 40 mg/kg of sodium thiopental and placed in a stereotaxic apparatus. After that, they received two infusions of vehicle (0.2%-ascorbic acid saline) or 6-OHDA (Sigma, 16.5 µg, 5,5 µl) into the right medial forebrain bundle (2.5 µl at 0.5 µL/min, AP: -4.4 mm, LL: -1.8 mm, DV: -8.8 mm from the bregma and 3.0 µl at 0.5 µL/min, AP: -4.0 mm, LL: -1.6 mm, DV: -9.0 mm; incisor bar: -3.3 mm). It was used an injection needle attached to a 10µL microsyringe (Hamilton, 701N) and an

infusion pump (Insight, Brazil). The needle was kept in the brain for 4 minutes after each infusion to allow drug diffusion. Rats received post-operative care until awake and were returned to their home cages.

Rotational Activity Analysis

Rotational activity was observed on a 76.5-cm elevated grid (80 x 60 cm) with 3 x 3 cm openings for 3 minutes in order to carry out the footfault test. It was also observed on an 80-cm diameter open field either for 4 minutes during an open field test session or for 35 minutes after drug challenging (see below).

Context-Induced Ipsilateral Rotational Activity (CIIRA) – CIIRA was defined as a binary variable in which the unity value indicates that the animal presented a 360-degree ipsilateral spin around its own axis during the testing session. The measure was taken either in the open field as in the footfault test. This behaviour was not drug-induced and any animal presenting contralateral rotational activity was not considered as presenting CIIRA.

Drug-Induced Rotational Activity (DIRA). Animals were infused (i.p.) with 20 or 40 mg/kg of methylphenidate (Ritalina®, Novartis) or 1 mg/kg of apomorphine (Sigma). Immediately after this, they were placed in the open field. The number of ipsi and contralateral rotations was registered and considered that an animal presented DIRA if it spun at least ten times during observation (ipsilaterally for MP and contralaterally for apomorphine challenging).

Behaviour Protocols

The animals were placed in the testing room 30 min before any test for room habituation.

Sensitivity and Specificity of the Footfault Test - CIIRA was observed in the footfault test 30 days after the 6-OHDA administration. After that, some animals were chosen for immunohistochemistry of tyrosine hydroxylase (TH) aiming to establish the extension of lesion.

Footfault Test x MP Challenging – CIIRA was observed in the footfault test 15 days after the 6-OHDA administration. One day after the footfault test, DIRA was

observed after challenging the animals with MP at 40 mg/kg. MP challenging at 20 mg/kg is described below, when a different cohort of animals was used.

Open Field Test and Drug Challenging x Footfault Test – CIIRA was observed in the open field for 4 min 27 days after the 6-OHDA administration and, two days later, for 3 min, on the footfault apparatus located in a different testing room. Seven and 21 days after the footfault test, MP (20 mg/kg) and apomorphine challenging, respectively, were carried out. An alternative protocol with a different cohort of animals was employed in which apomorphine was given right after the footfault test conducted 15 days after the 6-OHDA-lesion surgery at a dose of 11.0 µg.

CIIRA and Footfault Re-testing – The animals were placed on the footfault apparatus 15 days after the 6-OHDA administration. A day later, in order to verify the effects of a second exposition on CIIRA, the animals were re-exposed to the footfault apparatus.

Tyrosine-hydroxylase Immunohistochemistry.

Fourteen rats were selected for TH immunohistochemistry. They were anesthetized (ketamine + xilazine mix) and transcardially perfused with 0.9%-NaCl solution (150 mL) followed by a 4%-paraformaldehyde solution (about 150 mL) before the removal of their brain. The brains were further post-fixed overnight in a 4%-paraformaldehyde phosphate buffer saline (PBS) solution (pH 7.4) and then cryoprotected in a 30%-sucrose PBS solution until they were completely submerged. Coronal slices (45 µm) were obtained using a -20°C cryostat (Leica Microsystems GmbH). Midbrain slices were washed five times for 5 min each in PBS at room temperature, incubated with a rabbit anti-TH primary antibody (AB 152, Chemicon/Millipore, USA, 1:750) at room temperature for 18h, washed five times for 5 min each in PBS and incubated with the secondary antibody (AlexaFluor 568 A11036, Molecular Probes, USA, 1:400) at room temperature for 60 min. After another wash, sections were mounted and received an antifading solution (Fluorsave, Calbiochem, USA) and coverslipped. Antibodies were diluted in a pH 7.4 PBS. Slices were selected according to their coronal section and observed under a fluorescence microscope. The images were analyzed using the Scion Image for Windows program by pairing the

amount of nigral TH-positive neurons in the SNpc from both hemispheres, where the value of the contralateral hemisphere to the 6-OHDA administration site was normalized to 100%. Duplicates were obtained from each rat.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the SPSS 10.0 package for Windows.

The Mann-Whitney U test was used to compare the lesion extension of the animals that presented CIIRA in the footfault test with that of the animals that did not present CIIRA. A Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was built to evaluate the sensitivity (test power; ratio of true positives to combined true positives and false negatives) and specificity (ratio of true negatives to combined true negatives and false positives) of the footfault test for screening 6-OHDA-lesioned rats. A binary logistic regression model that used CIIRA as the dependent variable was used to estimate odd ratios for lesion extension. Parameters estimation is shown using units representing 10% of lesion extension \pm standard error of mean.

Data from the comparison between the footfault test, the open field test, or drug challenging are shown in 2x2 crosstables (Tables I to III). The difference between non-tie cases (i.e., cases in which the animal presented rotational activity only in one test) was taken as a difference in sensitivity of both tests. This difference was analyzed by the Sign Test, since the sum of non-tie cases was less than 20 in any analysis. The Sign Test was also used to compare the number of animals presenting CIIRA in the test and in the retest session of the footfault apparatus. In all cases, $P < 0.05$ was used to indicate statistical significance.

Results

Sensitivity and Specificity of the Footfault Test

The animals infused with 6-OHDA that showed CIIRA in the footfault test had higher lesion extension than those that did not show CIIRA (Mann-Whitney U test, $P=0.009$) (Fig. 1). Two examples of TH-immunohistochemistry are shown in Fig.2.

Figure 3 shows the ROC curve for CIIRA using TH immunohistochemistry as the standard procedure. Data were obtained from the results in Figure 1 (n=14) combined with those from *sham*-operated animals (that is, those that received only vehicle; n=39). *sham*-operated animals were considered to present a 0%-lesion and, in our results, showed no CIIRA at all. These data fit to the binary logistic regression model (Hosmer and Lemeshow Test; $\chi^2 = 2.322$, $df = 2$, $p = 0.313$), parameters of which were estimated, as follows: (1) for animals that did not present CIIRA, $B = -1.883 \pm 0.406$ (SE; $p < 0.001$); (2) for those that presented CIIRA, $B = -0.109 \pm 0.052$ (SE, $p = 0.037$), $\exp(B) = 1.116$ (95% CI, from 1.007 to 1.236), and $C = -9.081 \pm 4.554$ ($p = 0.046$).

These estimated parameters predict that (1) animals with nigral lesions larger than 90% have a very high probability of presenting CIIRA and (2) the footfault test is extremely specific for detecting lesioned animals, mainly when this specificity refers to lesions higher than 50%. The regression model was not precise in estimating the specificity for lesions higher than 90% due to the confidence interval of the evaluated parameters. However, the ROC curve shows that both sensitivity and specificity were higher than 0.85 at a 90%-lesion threshold and that sensitivity is quite smaller for a 50%-lesion threshold (0.583).

Between-tasks, Intertrial, and Time-dependent Comparisons

As shown in Table I, there was a difference in sensitivity between the footfault test and MP challenging at 40 mg/kg (Sign test, $P=0.021$) but not at 20 mg/kg (Sign test, $P=0.375$). There was a difference in sensitivity when apomorphine challenging was conducted 15 days but not right after the footfault test (Sign test, $P= 0.016$ and 1.000, respectively) (Table II).

As shown in Table III, the sensitivity of the footfault test was higher than that of the open field test (0.82 and 0.47, respectively), since 14 and 8 out of the same 17 animals tested in both tasks, respectively, showed CIIRA (Sign test, $P=0.031$). However, when using the same animals, there was no difference in sensitivity between the open field test and apomorphine challenging (Sign test, $P= 1.000$).

Concerning the animals that were submitted twice to the footfault test, only one out of 11 animals that showed CIIRA in the first session showed it again when re-

exposed to the task, indicating that there is a decrease in CIIRA across trials on subsequent days (Sign test, $P=0.002$).

No contralateral rotation was seen in the footfault test in our experiments. As previously mentioned, none of the 39 *sham*-operated animals presented CIIRA.

Discussion

The results show that the footfault test is a helpful tool for screening unilaterally 6-OHDA-lesioned animals due to its high sensitivity and specificity, especially if compared to apomorphine challenging, which is often used in the model.

Addressing the issue of using a behavioural test for a certain purpose, such as the footfault test for screening 6-OHDA-lesioned animals, is to establish parameters to be analyzed and verifying whether this confers to the test a useful sensitivity and specificity (*i.e.*, if it gives few false negatives and positives, respectively). We chose a 3-min period to work with the footfault test and defined CIIRA as a binary variable where 1 stands for animals that showed at least one single 360-degree ipsilateral spin and, therefore, indicating a lesioned rat. The results showed that the footfault test is very useful in detecting lesioned rats, as shown by the ROC curve, AUC of which is very close to 1.

Despite the fact that we have defined CIIRA and DIRA with different criteria for detecting lesioned rats (at least one spin is enough for CIIRA but not DIRA), the results showed that the footfault test still has a very high specificity for detecting animals with lesions higher than 60%. In fact, CIIRA and DIRA are behavioural responses induced by different agents. Drug administration clearly induces a stronger and longer response and, if the criteria were the same by increasing the number of spins necessary for CIIRA to equal 1, we believe that the footfault test would not have a high sensitivity or a high specificity.

MP and amphetamine increase dopaminergic transmission, since the former blocks dopamine uptake and the latter increases dopamine release (Kuczenski and Segal, 1997). The results show that the footfault test is less effective than MP challenging at 40 mg/kg, which promotes rotational activity in animals with at least a 50%

loss of TH-positive neurons (Hefti et al., 1980; Kuczenski and Segal, 1997). However, the footfault test is as sensitive as drug challenging with MP at 20 mg/kg and can be more sensitive than apomorphine at 1 mg/kg in screening 6-OHDA lesioned rats. When the footfault test and apomorphine challenging were carried out days apart, the footfault test was more sensitive than apomorphine. However, when apomorphine challenging was carried out right after the animals had been exposed to the footfault apparatus, both tasks were similar in detecting lesioned animals. We may speculate that this exposure induces a differential dopamine release into the striatum of both hemispheres, increasing their difference in sensitivity for apomorphine. Further studies may elucidate this. Apomorphine challenging is very often used in the model because it is very specific for promoting rotational activity in animals with at least a 90%-loss of nigral TH-positive neurons (Hefti et al., 1980). We may infer from our behavioural and immunohistochemical results that the lesion threshold required to induce CIIRA in the footfault test is between those thresholds for promoting DIRA in MP and apomorphine challenging.

Unilaterally lesioned animals typically display rotation towards the ipsilateral side without drug challenging (Costall et al., 1976; Dunnett and Iversen, 1982) and this is positively correlated to the degree of striatal activity (Schwartz and Huston, 1996). Therefore, it was our concern to verify whether the occurrence of CIIRA in a simpler task, such as the open field test, is enough to screen lesioned animals. If this were the case, the use of the footfault test would not be necessary. Since false positives and negatives are not that likely in the footfault test, we used this test rather than TH immunohistochemistry as the standard procedure to determine the sensitivity of the open field test. The results showed that the open field test is considerably less sensitive than the footfault test even when the former is carried out in a longer session. Therefore, the nature of the context is relevant and the use of the footfault test rather than the open field test is justified by our results. However, the open field test had the same sensitivity of apomorphine challenging in one of the experiments.

Some authors showed a relationship between the spontaneous ipsilateral rotational activity in the night period and the striatal dopamine content. However, this test could be applied only 6 or 7 days after the 6-OHDA (Matsuda et al., 1995). This

limitation is surmounted by the footfault test because it may be used until at least 1 month after the administration of 6-OHDA without losing its sensitivity. However, the footfault test cannot be used twice when both sessions are very close, since CIIRA sharply decreases in the second trial.

A single administration of a dopaminergic agonist leads to strong short- and long-term behavioural and biochemical changes (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970; Morelli et al., 1989; Simola et al., 2007). The footfault test requires only one short session and does not need the administration of a drug to show motor asymmetry. So, since the footfault test is less invasive than drug challenging, we may speculate that it alters the animal's behaviour and biochemistry to a lesser extent than drug challenging, but further studies are required to clarify this.

In summary, we present the footfault test as a tool for screening lesioned rats in a model for parkinsonism. The protocol used in the present study offers a simple and fast assessment without drug administration to induce rotation. Therefore, it may be useful in protocols that demand a drug-free screening of lesioned animals. Additional studies are needed to understand the mechanisms that triggers CIIRA in lesioned rats exposed to the footfault apparatus.

Acknowledgements: TMS was supported by PROFIX and PRONEX (CNPq). **CNPq supported RBS and CB.** ProDoc/CAPES supported AO.

References

- Castaneda E, Fleming S, Paquette MA, Boat K, Moffett J, Stachowiak EK, Bloom DC, Stachowiak MK (2005) Assessment of recovery in the hemiparkinson rat: drug-induced rotation is inadequate. *Physiol Behav* 84:525-535.
- Chopin P, Colpaert FC, Marien M (1999) Effects of alpha-2 adrenoceptor agonists and antagonists on circling behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 288:798-804.
- Costall B, Marsden CD, Naylor RJ, Pycock CJ (1976) The relationship between striatal and mesolimbic dopamine dysfunction and the nature of circling responses following 6-hydroxydopamine and electrolytic lesions of the ascending dopamine systems of rat brain. *Brain Res* 118:87-113.
- Deumens R, Blokland A, Prikaerts J (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175:303-317.
- Dunnett SB, Iversen SD (1982) Spontaneous and drug-induced rotation following localized 6-hydroxydopamine and kainic acid-induced lesions of the neostriatum. *Neuropharmacology* 21:899-908.
- Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ (1980) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* 195:123-137.
- Hernandez TD, Schallert T (1988) Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol* 102:318-324.
- Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, Kushner R, Swanger SA, Kopen GC, Wagner J, Shumsky JS, Fischer I (2006) Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair* 20:278-296.
- Kuczenski R, Segal DS (1997) Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J Neurochem* 68:2032-2037.
- Lubics A, Reglodi D, Tamas A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvari I (2005) Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res* 157:157-165.
- Matsuda H, Akechi Y, Shimada Y, Terasawa K, Watanabe H (1995) Relationship of the ipsilateral rotation in night period and striatal dopamine content reduction in unilateral nigrostriatal 6-OHDA lesioned rats. *Brain Res* 686:111-114.
- Metz GA, Tse A, Ballermann M, Smith LK, Fouad K (2005) The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis. *Eur J Neurosci* 22:735-744.
- Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H (2000) Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods* 104:99-109.
- Morelli M, Fenu S, Garau L, Di Chiara G (1989) Time and dose dependence of the 'priming' of the expression of dopamine receptor supersensitivity. *Eur J Pharmacol* 162:329-335.

- Pitsikas N, Brambilla A, Besozzi C, Bonali P, Fodritto F, Grippa N, Scandroglio A, Borsini F (2001) Effects of cerestat and NBQX on functional and morphological outcomes in rat focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 68:443-447.
- Schwartz RK, Huston JP (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50:275-331.
- Simola N, Morelli M, Carta AR (2007) The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 11:151-167.
- Starkey ML, Barritt AW, Yip PK, Davies M, Hamers FP, McMahon SB, Bradbury EJ (2005) Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Exp Neurol* 195:524-539.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485-493.
- Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y (2005) Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 144:35-45.

Silvestrin et al., 2008.

Table I. Rotational activity in the footfault test and after MP challenging.

Rotational Activity		MP20 ^a		MP40 ^b	
		No	Yes	No	Yes
Footfault	No	2	1	3	9
	Yes	4	10	1	12
	Total	17		25	

Crosstabulation of the number of animals that presented or not rotational activity in two different tests, the footfault test (rows) and after MP challenging at different doses (columns: MP20 and MP40 represent MP at 20 and 40 mg/kg, respectively). ^a and ^b indicate P = 0.375 and 0.021, respectively (Sign test).

Silvestrin et al., 2008.

Table II. Rotational activity in the footfault test and after apomorphine challenging.

Rotational Activity		APO 0 day ^a		APO 15 days ^b	
		No	Yes	No	Yes
Footfault	No	7	0	3	0
	Yes	1	5	7	7
	Total	13		17	

Crosstabulation of the number of animals that presented or not rotational activity in two different tests, the footfault test (rows) and after apomorphine challenging (columns). This challenging was carried out either right after (APO 0 day) or 15 days after the footfault test (APO 15 days). ^a and ^b indicate $P = 1.000$ and 0.016 , respectively (Sign test).

Silvestrin et al., 2008.

Table III. Rotational activity in the open field test, in the footfault test, and after apomorphine challenging.

Rotational Activity		Footfault ^a		APO ^b	
		No	Yes	No	Yes
Open	No	3	6	8	1
Field	Yes	0	8	2	6
	Total	17		17	

Crosstabulation of the number of animals that presented or not rotational activity in the open field test (rows) and in the footfault test and after apomorphine challenging (columns). ^a and ^b indicate P = 0.031 and 1.000, respectively (Sign test).

Silvestrin et al., 2008.

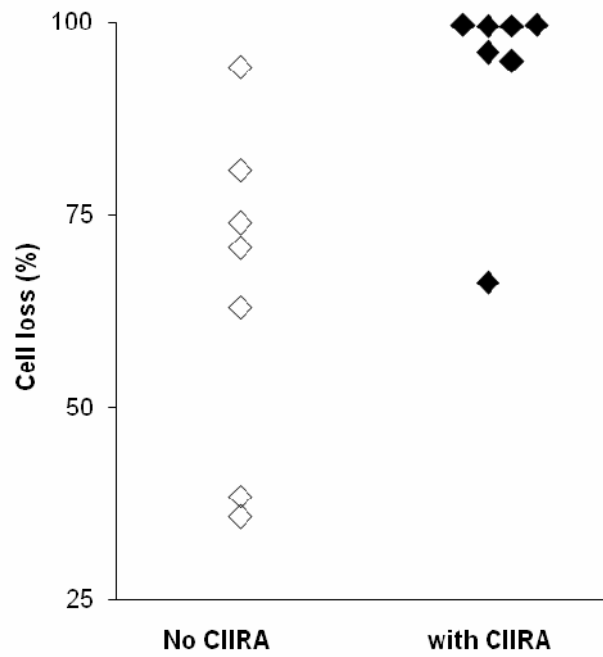


Figure 1. Lesion extent observed in animals submitted to the footfault test.

* Mann-Whitney- U test, $P=0.009$

Silvestrin et al., 2008.

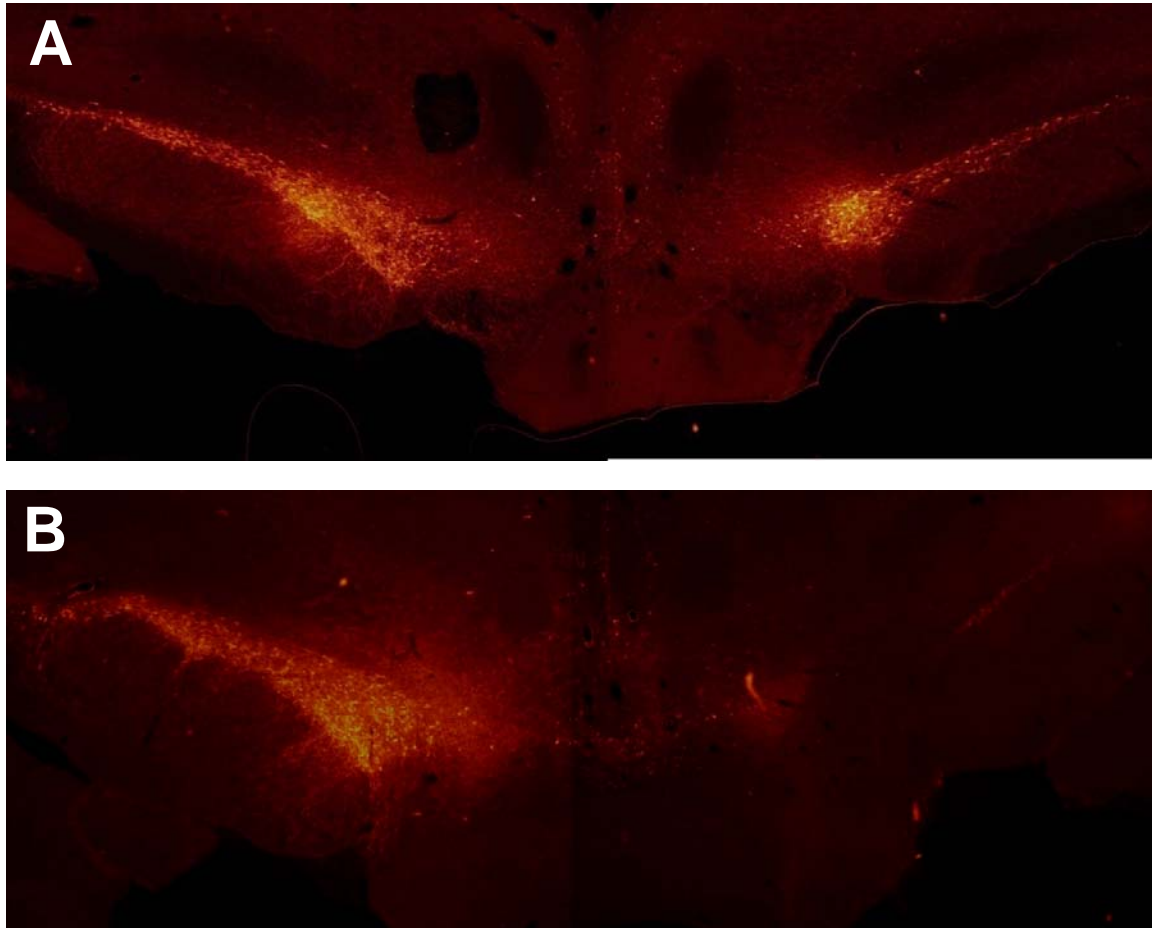


Figure 2. TH-immunohistochemistry showing dopamine-producing cells in the substantia nigra pars compacta from either (A) an animal that did not show CIIRA and presented 73% of cell loss, or (B) an animal that showed CIIRA and presented 99% of cell loss. In both cases, the hemisphere ipsilateral to the 6-OHDA infusion site is shown at right.

Silvestrin et al., 2008.

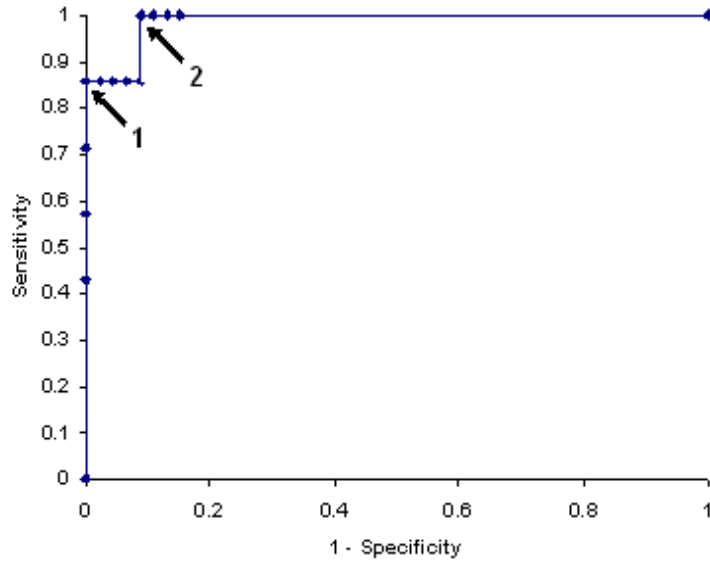


Figure. 3. ROC curve for CIIRA at different lesion extension thresholds. AUC = 0.988. Arrows 1 and 2 denote lesion values of 95% and 65%, respectively.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscou-se validar a aplicação do TMG como ferramenta de triagem de animais lesionados em um modelo animal de DP. Para isso, comparou-se a sensibilidade do teste proposto com a sensibilidade do teste de atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas, um teste padrão utilizado no modelo. Os resultados aqui apresentados demonstram a potencial aplicabilidade do TMG em modelo animal da DP em estágio avançado, visto que esse teste é eficiente na triagem de animais altamente lesionados com 6-OHDA.

Lesões unilaterais do sistema dopaminérgico induzem assimetrias tanto nos níveis de DA no encéfalo quanto na sensibilidade das respostas a esse neurotransmissor. No modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA administrada unilateralmente em ratos, a lesão do feixe prosencefálico medial resulta em diminuição ipsilateral de DA no corpo estriado e no núcleo *accumbens* e leva a uma hipersensibilização dopaminérgica, seja pelo aumento do número ou da responsividade dos receptores (Torres and Dunnett, 2007). Esse desequilíbrio funcional na transmissão dopaminérgica gera atividade rotacional típica em resposta à administração de agentes dopaminomiméticos (Simola et al., 2007). A avaliação da atividade rotacional induzida por drogas é uma ferramenta farmacológica relativamente simples utilizada na identificação e no estudo de novos compostos ou estratégias antiparkinsonianos, tais como implantes celulares (Mukhida et al., 2001; Visanji et al., 2006). Apesar da sua ampla utilização, o teste de atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas é (a) um teste invasivo e (b) requer bastante tempo para ser executado.

Animais com lesões unilaterais comumente realizam rotações ipsilaterais ao hemisfério lesionado sem a utilização de qualquer droga para induzi-las (Costall et al., 1976; Dunnett e Iversen, 1982) e isso parece estar positivamente correlacionado com o grau de atividade estriatal (Schwartzing e Huston, 1996). O presente estudo mostra, pela primeira vez, a ocorrência de rotações ipsilaterais sem a utilização de drogas quando ratos lesionados unilateralmente com 6-OHDA foram testados no TMG.

No presente trabalho, também buscamos verificar se a ocorrência de atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto em um teste mais simples, o campo aberto, é tão eficiente para detectar animais lesionados, pois em caso afirmativo o uso do TMG seria desnecessário. Uma vez que a ocorrência de resultados falso-positivos ou falso-negativos é pouco provável no TMG, utilizamos esse teste ao invés da imunoistoquímica para TH como procedimento padrão para determinar a sensibilidade do teste no campo aberto. Os resultados mostraram que o teste no campo aberto é consideravelmente menos sensível do que o TMG mesmo quando o primeiro tem maior duração. Portanto, a natureza do contexto é relevante e o uso do TMG, mais do que do campo aberto, é justificado pelos nossos resultados. No entanto, o teste no campo aberto apresentou a mesma sensibilidade que o teste de atividade rotacional induzida por apomorfina em um dos experimentos.

Alguns autores demonstraram uma relação entre a atividade rotacional espontânea noturna e o conteúdo de DA (Matsuda et al., 1995). No entanto, além de requerer observação do animal durante todo o período noturno, esse teste só é eficiente quando aplicado 6 ou 7 dias após a infusão de 6-OHDA, limitação que é superada pelo TMG, uma vez que esse teste pode ser aplicado pelo menos até 2 meses depois da infusão de 6-OHDA sem perder sua sensibilidade (dados não mostrados). No entanto, o TMG não pode ser utilizado duas vezes quando as duas sessões são muito próximas, visto que a atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto reduz drasticamente na segunda sessão.

Quando comparado ao teste de atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas, os resultados mostram que o TMG é menos sensível que a administração de MF 40 mg/kg. O MF, assim como a anfetamina, leva a um aumento nas concentrações extracelulares de DA. Embora essas duas drogas tenham diferentes afinidades pelo transportador de DA e gerem diferentes perfis de liberação desse neurotransmissor, a dose de 2.5 mg/kg de anfetamina equivale à dose de 20 mg/kg de MF em termos de resposta comportamental (Kuczenski e Segal, 1997). Sabe-se ainda que a anfetamina na dose de 5mg/kg induz atividade rotacional em animais que apresentem um mínimo de 50% de neurônios nigro-estriatais destruídos (Hefti et al., 1980a) e é provável que o teste de atividade rotacional induzida por drogas

dopaminomiméticas com 40 mg/kg compartilhe esta característica. Assim, o TMG é um teste mais exigente que o teste de atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas com MF 40 mg/kg provavelmente por requerer um maior grau de lesão para que o animal seja detectado. No entanto, o TMG é tão sensível quanto o teste de atividade rotacional induzida por MF 20mg/kg e pode ser mais sensível do que o teste de atividade rotacional induzida por apomorfina 1mg/kg na triagem de animais lesionados com 6-OHDA. Quando o TMG e o teste de atividade rotacional induzida por apomorfina foram realizados em dias diferentes, o TMG se mostrou mais sensível do que o teste de atividade rotacional induzida por apomorfina. No entanto, quando este último teste foi realizado imediatamente após o TMG, os testes foram similares na detecção de animais lesionados. Podemos especular que essa exposição induz diferentes perfis de liberação de dopamina no corpo estriado dos dois hemisférios, aumentando o desequilíbrio na sensibilidade para a apomorfina entre os dois hemisférios. Estudos adicionais são necessários para elucidar tal mecanismo. O teste de atividade rotacional induzida por apomorfina é amplamente utilizado no modelo e promove atividade rotacional contralateral em animais com um mínimo de 90% de perda de neurônios nigrais TH-positivos (Hefti et al., 1980b). Vale ressaltar que a apomorfina foi considerada a droga mais apropriada para a predição de amplas lesões estriatais produzidas por 6-OHDA (Hudson et al., 1993). De acordo com nossos resultados comportamentais e da imunoistoquímica, podemos inferir que o limiar de lesão necessário para indução de atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto no TMG está entre os limiares para promover atividade rotacional ipsilateral induzida por drogas dopaminomiméticas no teste de atividade rotacional induzida por MF e apomorfina.

Apesar de termos utilizado critérios diferentes para definição da variável ARIICO e atividade rotacional ipsilateral induzida por drogas dopaminomiméticas para detecção de animais lesionados (um único giro é suficiente para atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto, mas não para atividade rotacional ipsilateral induzida por drogas dopaminomiméticas), os resultados mostraram que o TMG ainda tem alta especificidade na detecção de animais com lesões maiores que 60%. De fato, atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto e atividade rotacional ipsilateral

induzida por drogas dopaminomiméticas são respostas comportamentais induzidas por diferentes agentes, e a administração de drogas claramente induz uma resposta mais forte e duradoura. Se, se os critérios fossem os mesmos, aumentando-se o número de giros necessários para ARIICO para igualar 1, acreditamos que o TMG não teria boa sensibilidade e seria inútil.

Apesar da ampla utilização do teste atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas para análise de animais lesionados, um teste comportamental menos invasivo que possa avaliar o animal em um estado sem ação de drogas pode refletir uma resposta mais natural após a lesão (Roghani et al., 2002). Além disso, sabe-se que uma única administração de um agonista dopaminérgico leva ao *priming*, que consiste em uma resposta rotacional sensibilizada a um agonista subsequente administrado alguns dias depois (Morelli et al., 1989). Há indução de uma cascata de alterações moleculares em nível pós-sináptico no corpo estriado, com depleção de DA resultando em respostas motoras anormais (Simola et al., 2007). Além disso, a utilização de agentes dopaminomiméticos promove alterações comportamentais por pelo menos 3 horas após o teste de atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas (Morelli et al., 1989; Simola et al., 2007; Ungerstedt e Arbuthnott, 1970). Já a realização do TMG necessita de uma única sessão bastante curta e não requer a infusão aguda de uma droga para aparecimento dos efeitos da lesão. Então, visto que o TMG é menos invasivo que o teste atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas, pode-se sugerir que o animal fique menos sujeito a alterações comportamentais e bioquímicas. Entretanto, estudos adicionais são necessários para melhor compreendermos essa situação. Além disso, o TMG é muito mais rápido e prático, otimizando a utilização dos animais, o tempo de estudo e não requer equipamentos técnicos ou especializados.

Não se conhece, ainda, qual o mecanismo subjacente à atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto no TMG. No caso das rotações induzidas por anfetamina, sabe-se que o corpo estriado e o núcleo *accumbens* têm papéis distintos na atividade rotacional, onde as diferenças na fisiologia dopaminérgica entre os corpos estriados intacto e o lesionado são responsáveis pela direção das rotações, enquanto que o núcleo *accumbens*, por outro lado, fica sendo responsável pela iniciação e

amplitude dessa resposta. Segundo alguns autores, há uma hipótese de que a natureza da assimetria poderia se dar pela preferência de posição no espaço bilateral, já que um animal lesionado negligencia o espaço contralateral, tendo assim um viés para o lado ipsilateral, fazendo com que gire em direção a ele (Torres e Dunnett, 2007). O comportamento exploratório em roedores vai ser sempre influenciado por motivações conflitantes de explorar o ambiente novo potencialmente perigoso ou ficar num local mais seguro. Logo, o comportamento do animal em um novo ambiente sempre será impulsionado pela curiosidade, pela motivação de explorar e, ao mesmo tempo, será inibido pela neofobia (Harro, 1993). A “novidade”, em alguns casos, leva a um aumento da liberação de DA no núcleo *accumbens*, permitindo-nos especular um papel para essa estrutura na indução da atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto no TMG (Rebec et al., 1997; Saigusa et al., 1999; van der Elst et al., 2005). Além da novidade, o TMG pode servir como um agente estressor; como se sabe, o estresse modula o sistema motor afetando a locomoção e a postura (Metz, 2007). Mais ainda, demonstrou-se que há ativação de sistemas dopaminérgicos frente a alguns modelos animais de estresse (Abercrombie et al., 1989; Imperato et al., 1991), sugerindo-nos um outro possível elemento gerador da atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto no TMG.

O TMG é muito eficiente quando os animais apresentam alto grau de lesão, pois se verificou que, dentre sete sujeitos, somente um animal com 95% de lesão nigral não apresentou atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto. Além disso, somente um entre sete animais com lesão menor que 81% apresentou atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto. Vale salientar que esse tipo de exceção, ou seja, animais com menor grau de lesão girando, também é verificada quando se utiliza a atividade rotacional induzida por drogas dopaminomiméticas (Hefti et al., 1980b). O potencial do TMG é ainda destacado pelo fato de que nenhum animal *sham* operado apresenta atividade rotacional ipsilateral induzida pelo contexto, o que indica que a ocorrência de falsos positivos seja improvável.

Em resumo, apresentamos o TMG como uma ferramenta para a triagem de animais altamente lesionados em modelo de DP. O protocolo utilizado no presente estudo oferece uma avaliação fácil de ser executada, econômica, rápida, sem a

utilização de drogas infundidas agudamente para indução de atividade rotacional nem equipamentos sofisticados de análise. Portanto, o TMG pode ser bastante útil em protocolos que requeiram uma triagem rápida e que não necessite de drogas para sua execução. Entretanto, é evidente que estudos adicionais são necessários para compreensão do mecanismo pelo qual o ambiente do TMG estimula o padrão rotacional em ratos.

8. REFERÊNCIAS

Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem*, 1989; 52: 1655-8.

Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol*, 2000; 60: 409-70.

Barth TM, Jones TA, Schallert T. Functional subdivisions of the rat somatic sensorimotor cortex. *Behav Brain Res*, 1990; 39: 73-95.

Castaneda E, Fleming S, Paquette MA, Boat K, Moffett J, Stachowiak EK, Bloom DC, Stachowiak MK. Assessment of recovery in the hemiparkinson rat: drug-induced rotation is inadequate. *Physiol Behav*, 2005; 84: 525-35.

Chopin P, Colpaert FC, Marien M. Effects of alpha-2 adrenoceptor agonists and antagonists on circling behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999; 288: 798-804.

Constantino AE, Honig LS. Parkinson's disease. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2001; 2001: dn4.

Costall B, Marsden CD, Naylor RJ, Pycock CJ. The relationship between striatal and mesolimbic dopamine dysfunction and the nature of circling responses following 6-hydroxydopamine and electrolytic lesions of the ascending dopamine systems of rat brain. *Brain Res*, 1976; 118: 87-113.

Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, 2002; 175: 303-17.

Dunnett SB, Iversen SD. Spontaneous and drug-induced rotation following localized 6-hydroxydopamine and kainic acid-induced lesions of the neostriatum. *Neuropharmacology*, 1982; 21: 899-908.

Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2003; 24: 395-401.

Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol*, 2005; 193: 279-90.

Hefti F, Melamed E, Sahakian BJ, Wurtman RJ. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacol Biochem Behav*, 1980a; 12: 185-8.

Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res*, 1980b; 195: 123-37.

Hernandez TD, Schallert T. Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol*, 1988; 102: 318-24.

Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, Kushner R, Swanger SA, Kopen GC, Wagner J, Shumsky JS, Fischer I. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair*, 2006; 20: 278-96.

Hornykiewicz O. Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: possible neurochemical mechanisms. *Adv Neurol*, 1993; 60: 140-7.

Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res*, 1993; 626: 167-74.

Imperato A, Puglisi-Allegra S, Casolini P, Angelucci L. Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res*, 1991; 538: 111-7.

Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol*, 1998; 152: 259-77.

Kuczenski R, Segal DS. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J Neurochem*, 1997; 68: 2032-7.

Lim KL, Dawson VL, Dawson TM. The cast of molecular characters in Parkinson's disease: felons, conspirators, and suspects. *Ann N Y Acad Sci*, 2003; 991: 80-92.

Lubics A, Reglodi D, Tamas A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvari I. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res*, 2005; 157: 157-65.

Matsuda H, Akechi Y, Shimada Y, Terasawa K, Watanabe H. Relationship of the ipsilateral rotation in night period and striatal dopamine content reduction in unilateral nigrostriatal 6-OHDA lesioned rats. *Brain Res*, 1995; 686: 111-4.

Metz GA. Stress as a modulator of motor system function and pathology. *Rev Neurosci*, 2007; 18: 209-22.

Metz GA, Tse A, Ballermann M, Smith LK, Fouad K. The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis. *Eur J Neurosci*, 2005; 22: 735-44.

Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods*, 2000; 104: 99-109.

Morelli M, Fenu S, Garau L, Di Chiara G. Time and dose dependence of the 'priming' of the expression of dopamine receptor supersensitivity. *Eur J Pharmacol*, 1989; 162: 329-35.

Mukhida K, Baker KA, Sadi D, Mendez I. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci*, 2001; 21: 3521-30.

Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 2000; 23: S8-19.

Pitsikas N, Brambilla A, Besozzi C, Bonali P, Fodritto F, Grippa N, Scandroglio A, Borsini F. Effects of cerestat and NBQX on functional and morphological outcomes in rat focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*, 2001; 68: 443-7.

Rebec GV, Grabner CP, Johnson M, Pierce RC, Bardo MT. Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience*, 1997; 76: 707-14.

Roghani M, Behzadi G, Baluchnejadmojarad T. Efficacy of elevated body swing test in the early model of Parkinson's disease in rat. *Physiol Behav*, 2002; 76: 507-10.

Saigusa T, Tuinstra T, Koshikawa N, Cools AR. High and low responders to novelty: effects of a catecholamine synthesis inhibitor on novelty-induced changes in behaviour and release of accumbal dopamine. *Neuroscience*, 1999; 88: 1153-63.

Schwartzing RK, Huston JP. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*, 1996; 50: 275-331.

Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, 2007; 11: 151-67.

Starkey ML, Barritt AW, Yip PK, Davies M, Hamers FP, McMahon SB, Bradbury EJ. Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Exp Neurol*, 2005; 195: 524-39.

Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 2007; 30: 244-50.

Torres EM, Dunnett SB. Amphetamine induced rotation in the assessment of lesions and grafts in the unilateral rat model of Parkinson's disease. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2007; 17: 206-14.

Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM. Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res*, 2006; 169: 1-9.

Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, 1970; 24: 485-93.

van der Elst MC, Verheij MM, Roubos EW, Ellenbroek BA, Veening JG, Cools AR. A single exposure to novelty differentially affects the accumbal dopaminergic system of apomorphine-susceptible and apomorphine-unsusceptible rats. *Life Sci*, 2005; 76: 1391-406.

Visanji NP, O'Neill MJ, Duty S. Nicotine, but neither the alpha4beta2 ligand RJR2403 nor an alpha7 nAChR subtype selective agonist, protects against a partial 6-hydroxydopamine lesion of the rat median forebrain bundle. *Neuropharmacology*, 2006; 51: 506-16.

Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, Akatsu H, Yamada T, Hashimoto M. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 345: 967-72.

Weiner WJ. Initial treatment of Parkinson disease: levodopa or dopamine agonists. *Arch Neurol*, 2004; 61: 1966-9.

Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol*, 2007; 150: 963-76.

Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*, 2005; 144: 35-45.

Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol*, 1999; 154: 1423-9.